

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-303990

(43)公開日 平成6年(1994)11月1日

(51)Int.Cl. ⁵ C 12 P 21/08 C 12 N 5/20 15/06	識別記号 8214-4B	府内整理番号 F I	技術表示箇所
	8412-4B 9050-4B	C 12 N 5/00 15/00	B C
審査請求 未請求 請求項の数 4 FD (全 5 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願平5-120956

(22)出願日 平成5年(1993)4月24日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成4年10月30日、
日本免疫学会は発行の「日本免疫学会総会記録第22巻」
に発表

(71)出願人 000000952
鐘紡株式会社
東京都墨田区墨田五丁目17番4号
(72)発明者 西田 佳代
東京都豊島区東池袋2丁目21番6-907号
(72)発明者 西田 正
東京都豊島区東池袋2丁目21番6-907号
(72)発明者 蓬沼 行人
兵庫県神戸市東灘区向洋町中1丁目10番
101-702号
(72)発明者 関根 知世子
東京都江東区木場5丁目6番36-604号

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 モノクローナル抗体、それを産生するハイブリドーマおよび該抗体の製造方法

(57)【要約】

【構成】 ヒトイントグリン β_1 を特異的に認識するモノクローナル抗体、それを産生するハイブリドーマおよび該抗体の製造方法。

【効果】 本発明のモノクローナル抗体を用いることにより、ヒト組織中のヒトイントグリン β_1 を容易に検出することができる。また、本発明のモノクローナル抗体を用いることにより、ヒト組織中からヒトイントグリン β_1 を分離精製することができる。従って、本発明のモノクローナル抗体はヒトイントグリン β_1 の検出試薬や分離精製用試薬として有用である。更に、本発明のモノクローナル抗体はヒトB細胞リンパ腫(RPMI 8866)のフィプロネクチンに対する接着を抑制することから、フィプロネクチン等の細胞接着蛋白と関連する、炎症性疾患の治療薬としての応用が期待される。

AP2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトイントイグリン β_7 を特異的に認識するモノクローナル抗体。

【請求項2】 請求項1に記載の抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項3】 抗ヒトイントイグリン α_4 抗体と抗ヒトイントイグリン β_1 抗体とを用いて、ヒトメモリーT細胞、ヒト単球およびヒトB細胞リンパ腫のなかから選択されるヒトリンパ細胞から、フローサイトメトリー分析法により、ヒトイントイグリン α_4 を発現しているがヒトイントイグリン β_1 を発現していない細胞を選出した後、該細胞の可溶化溶液を抗ヒトイントイグリン α_4 抗体を固定化したイムノアフィニティカラムに付してヒトイントイグリン α_4 β_7 のヘテロダイマーを得、次にこれを抗原として哺乳小動物を免疫した後、その脾臓を摘出して抗体産生脾細胞を調製し、該抗体産生脾細胞と骨髄腫細胞とを細胞融合してハイブリドーマを調製し、該ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体をフローサイトメトリー分析法によりスクリーニングしてヒトイントイグリン α_4 を認識せずにヒトイントイグリン β_7 を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選別し、該ハイブリドーマを、これと適合性のある哺乳小動物の腹腔内に接種して増殖させ、該腹水から生成したモノクローナル抗体を分離精製することを特徴とするヒトイントイグリン β_7 を特異的に認識するモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項4】 ヒトB細胞リンパ腫がRPMI 8866である請求項3に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はヒトイントイグリン β_7 を特異的に認識するモノクローナル抗体、それを産生するハイブリドーマおよび該抗体の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】インテグリン α_4 β_1 (VLA-4)は单核白血球の大部分に発現しており、細胞接着蛋白の一つであるVCAM-1との結合を介して炎症部位に浸潤し、炎症反応を起こす。従って、喘息、アレルギー、関節炎および動脈硬化症のような疾患においては、VLA-4とVCAM-1との接着を阻害することが治療上重要であると考えられている(Bosco M. C. Chanら、J. Biol. Chem.、第267巻、8366頁、1992年)。

【0003】VLA-4はインテグリン β_1 サブファミリーに属し、その構成はインテグリン α_4 とインテグリン β_1 のヘテロダイマーから成る。しかし、このインテグリン α_4 サブユニットはインテグリン β_1 のみならず、ヒトではインテグリン β_7 とも会合することが報告されている(Bosco M. C. Chanら、J. Biol. Chem.、第267巻、8366頁、1992年およびDavid J. Erleら、J. Biol.

iol. Chem.、第266巻、11009頁、1991年)。

【0004】ヒトイントイグリン α_4 β_7 はヒトイントイグリン α_4 β_1 と同様、フィプロネクチンやVCAM-1を介して内皮細胞にリンパ球を接着させるという報告もある(Curzio Rueggら、J. Cell Biol.、第117巻、179頁、1992年)。

【0005】従来、インテグリンサブユニットに対する種々の抗体が知られているが、ヒトイントイグリン β_7 に対するモノクローナル抗体は、知られていなかった。

10 【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明はヒトイントイグリン β_7 と特異的に結合できるモノクローナル抗体、それを産生するハイブリドーマおよび該抗体の製造方法を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、種々検討した結果、ヒトイントイグリン β_7 を特異的に認識するモノクローナル抗体およびヒトイントイグリン β_7 を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを見いだし、本発明を完成させた。

【0008】以下、本発明を詳細に説明する。

【0009】本発明のモノクローナル抗体およびそれを産生するハイブリドーマは、以下の製造方法によって得ることができる。

(抗原の調製) 本発明では、哺乳動物への免疫に用いる抗原には、精製したヒトイントイグリン α_4 β_7 のヘテロダイマーを用いる。

【0010】ヒトイントイグリン α_4 β_7 のヘテロダイマーは、以下のようにして得ることができる。

30 【0011】先ず、抗ヒトイントイグリン α_4 抗体(SG/17、順天堂大学医学部免疫学教室から入手)と抗ヒトイントイグリン β_1 抗体(SG/19、順天堂大学医学部免疫学教室から入手)とを用いて、ヒトメモリーT細胞、ヒト単球およびヒトB細胞リンパ腫のなかから選択されるヒトリンパ細胞から、フローサイトメトリー分析法により、ヒトイントイグリン α_4 を発現しているがヒトイントイグリン β_1 を発現していない細胞を選出する(選出された細胞は、ヒトイントイグリン α_4 サブユニットとヒトイントイグリン β_7 サブユニットとがヘテロダイマーを構成していると考えられる)。次いで、選出された細胞を非イオン性の界面活性剤が含まれる可溶化バッファーで可溶化し、抗ヒトイントイグリン α_4 抗体(SG/17)を固定化したイムノアフィニティカラムに通してヒトイントイグリン α_4 β_7 のヘテロダイマーを該カラムに吸着させた後、酸で溶出し、ヒトイントイグリン α_4 β_7 のヘテロダイマーを含む画分を得る。最後に、得られた画分を蒸留水にて一夜透析した後、凍結乾燥する。

40 【0012】上記のフローサイトメトリー分析法によって選出された細胞としては、ヒトB細胞リンパ腫であるRPMI 8866(順天堂大学医学部免疫学教室から入

50 RPMI 8866(順天堂大学医学部免疫学教室から入

手)が例示される。

【0013】(ハイブリドーマの製造)ハイブリドーマの製造は、常法に従って次のようにして行うことができる。即ち、上記のようにして得られるヒトインテグリン $\alpha_4\beta_1$ の凍結乾燥品(抗原)をリン酸緩衝生理食塩液に溶解し、これをハムスター等の哺乳小動物に投与して該動物を免疫した後、その脾臓を摘出して抗体産生脾細胞を調製する。

【0014】免疫された動物の抗体産生脾細胞は骨髄腫細胞と細胞融合されるが、用いる骨髄腫細胞は、例えば、マウス由来のものが好ましい。細胞融合は、例えば、ミルステインらの方法(C. Milstein ら、Nature、第256巻、495頁、1975年)に準じて行われる。即ち、30%~60%ポリエチレンギリコール(平均分子量1000~4000)を用いて30°C~40°Cの温度で約1~3分反応させることによって行われる。

【0015】このようにして得られるハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体を、フローサイトメトリー分析法によりスクリーニングを行い、ヒトインテグリン α_4 を認識せずにヒトインテグリン β_1 を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選別する。

【0016】上記により得られたハイブリドーマは、「抗ヒトインテグリン β_1 モノクローナル抗体(TN114)産生ハイブリドーマ」と表示し、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託した[受託番号、微工研菌寄第13202号(FERM P-13202)]。

【0017】(モノクローナル抗体の製造)本発明のモノクローナル抗体は、上記により得られるハイブリドーマを、これと適合性のある哺乳小動物、例えば、マウス等の腹腔内に接種し、増殖させ、その腹水から本発明のモノクローナル抗体を常法により分離精製することによって得られる。

【0018】ハイブリドーマとして「抗ヒトインテグリン β_1 モノクローナル抗体(TN114)産生ハイブリドーマ」を用いることにより、本発明のモノクローナル抗体(TN114)が得られる。

【0019】

【発明の作用効果】本発明のモノクローナル抗体を用いることにより、ヒト組織中のヒトインテグリン β_1 を容易に検出することができる。また、本発明のモノクローナル抗体を用いることにより、ヒト組織中からヒトインテグリン β_1 を分離精製することができる。従って、本発明のモノクローナル抗体は、ヒトインテグリン β_1 の検出試薬や分離精製用試薬として有用である。

【0020】更に、本発明のモノクローナル抗体(TN114)はヒトB細胞リンパ腫(RPMI8866)のフィブロネクチンに対する接着を抑制することから(試験例1参照)、フィブロネクチン等の細胞接着蛋白と関連する、炎症性疾患の治療薬としての応用が期待され

る。

【0021】試験例1

抗ヒトインテグリン β_1 モノクローナル抗体による、ヒトB細胞リンパ腫(RPMI8866)のフィブロネクチンに対する接着の抑制作用:

(1) 検体

・本発明のモノクローナル抗体(TN114、実施例2参照)

【0022】(2) 試験方法

- 10 96ウエルマイクロタイタープレートの各ウエルに、リン酸緩衝生理食塩液(pH7.4、以下PBSと略記する)に溶解したヒト血漿フィブロネクチン(GIBCO製)10 μ g/mlを50 μ lずつ分注し、4°Cで一夜培養した。各ウエルの溶液を除去し、PBSで洗浄後、1%ウシ血清アルブミンを含有するPBSで2時間プロッキングを行った。その後、PBSで3回洗浄し、ウシ血清アルブミンを除去した。
- 20 【0023】他方、ヒトB細胞リンパ腫(RPMI8866)を10 μ Mの2',7'-ビス(カルボキシエチル)カルボキシフルオレセインテトラアセトキシメチルエステル(以下BCECF-AMと略記する)のジメチルスルホキシド溶液(同仁化学製)と共に30分間培養した後、無血清リンパ球培地(AIM VTM培地、GIBCO製)で3回洗浄した。得られたBCECF-AMを取り込まれたヒトB細胞リンパ腫(RPMI8866)と検体とを予め30分間培養後、先の96ウエルマイクロタイタープレートの各ウエルに分注した(各ウエル当たり、該細胞: 1×10⁵個、検体濃度: 20 μ g/ml)。37°Cで10分間培養した後、各ウエルをPBSで満たし、プレートシール(大日本製薬製)で密閉した。該プレートを逆にして800回転/分で2分間遠心回転を行った。各ウエルの溶液を除去した後、1%ノニデットP-40TM(ナカラライテスク製)を100 μ l加え、接着によって残っている細胞を溶解させた。次いで、各ウエル中のBCECF-AM量をフルオロスキャンを用いて測定し、これを指標にしてヒトB細胞リンパ腫(RPMI8866)のフィブロネクチンに対する接着率を求めた。接着率は、フィブロネクチンをコートしていないウエルを用いて上記試験を行った場合の蛍光強度を0%とし、上記におけるBCECF-AMを取り込まれたヒトB細胞リンパ腫(RPMI8866)(1×10⁵個)を1%ノニデットP-40TM100 μ lに溶解させた場合の蛍光強度を100%として算出した。
- 30 【0024】なお、対照として、抗ヒトインテグリン β_1 抗体(SG/19)、抗ヒトインテグリン α_4 抗体(SG/73、順天堂大学医学部免疫学教室から入手)および抗体非添加の場合における接着率も上記と同様にして求めた。
- 40 【0025】(3) 試験結果
50 結果を図1に示した。図1から明らかなように、本発明

のモノクローナル抗体は、ヒトB細胞リンパ腫（RPMI 8866）のフィプロネクチンに対する接着を抑制することが判明した。

【0026】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明を説明する。

【0027】なお、実施例においては、以下の①-③の培地を目的に応じて使用した。

①RPMI 1640培地

②細胞（骨髄腫細胞またはハイブリドーマ）用培地
上記①の培地に以下のものを添加した培地

10% ウシ胎児血清

2mM L-グルタミン

50μM 2-メルカプトエタノール

100 U/mI ペニシリング

100 μg/mI ストレプトマイシン

20mM 炭酸水素ナトリウム

③HAT培地

上記②の培地に更に、以下のものを添加した培地

0.1 mM ヒポキサンチン

0.4 μM アミノブテリン

16μM チミジン

【0028】実施例1

ヒトインテグリンβ₁を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ：

（抗原の調製）種々のヒトリンパ細胞（ 6×10^6 個）を三分し、夫々 $50\mu l$ のPBSに懸濁した。そのうちの1つには抗ヒトインテグリンα₄ 抗体（SG/17）を、もう1つには抗ヒトインテグリンβ₁ 抗体（SG/19）を夫々 $1\mu g$ ずつ添加し、残り1つには何も添加せず、それらを $4^\circ C$ で30分間培養した。培養後、夫々をPBSで洗浄した後、ヤギ抗マウス IgG-FITC（オリバース製） $0.5\mu l$ を含有するPBS $50\mu l$ に懸濁した。次いで、再度 $4^\circ C$ で30分間培養し、PBSで洗浄した後、それらをPBS $200\mu l$ に再懸濁した。各懸濁液をフローサイトメトリーにより分析し、ヒトインテグリンα₄ を発現しているがヒトインテグリンβ₁ を発現していない細胞を選出し、ヒトB細胞リンパ腫であるRPMI 8866を得た。

【0029】得られたRPMI 8866（ 3×10^8 個）を可溶化バッファー [50mMトリス-塩酸、pH 7.6、150 mM塩化ナトリウム、1%ボリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル、50mMヨードアセトアミド、2 mM塩化マグネシウム、2 mM塩化カルシウム、0.1%アジ化ナトリウム、1 mMフッ化フェニルメチルスルホニル] 30mIにより可溶化し、抗ヒトインテグリンα₄ 抗体（SG/17）をセファロースビーズに結合させたイムノアフィニティカラムに吸着させた。次いで、0.1 Mグリシン-塩酸バッファー（pH 3.0）で溶出し、ヒトインテグリンα₄ β₁ のヘテロダイマーを含む画分を得た。得られた画分を、蒸留水にて一夜透析した後、凍

結乾燥させた（収量 $10\mu g$ ）。該凍結乾燥品をSDS-ポリアクリラミドゲル電気泳動法に付し、120-150 kDaにヒトイントグリンα₄ β₁ の存在を確認した。

【0030】（ハイブリドーマの製造）上記により得られたヒトイントグリンα₄ β₁ のヘテロダイマーの凍結乾燥品 $10\mu g$ を 0.5mI のPBSに溶解し、1~2週間間隔でアルメニアハムスターの腹腔内に5回注射して免疫した。

【0031】最終免疫の4日後にハムスターの脾臓を摘出して抗体産生脾細胞を調製した。次いで、該脾細胞とマウス骨髄腫細胞P3×63A_g8U.1 (ATCC CRL 1597)を5:1の割合で混合し、50%ポリエチレングリコール（平均分子量4000）を用いて $37^\circ C$ で2分間反応させることにより細胞融合を行った。

【0032】細胞融合を行った細胞を96ウエルマイクロタイヤープレートに植え込み、HAT培地にて $37^\circ C$ 、5%炭酸ガス条件下で7~14日培養を行った。

【0033】次いで、増殖した細胞の培養上清についてフローサイトメトリー分析法によりスクリーニングを行った。フローサイトメトリー分析法の詳細は、以下の通りである。

【0034】 $160\mu l$ のヒトイントグリンβ₁ ハイブリドーマ培養上清を二分し、半分は 2×10^5 個のRPMI 8866と共に、残り半分はヒトイントグリンβ₁ を有しない 2×10^5 個のRamos細胞(ATCC CRL 1596)と共に $4^\circ C$ で30分間培養した。PBSで洗浄後、 $0.5\mu l$ のヤギ抗ハムスターIgG-FITC(CALTAG製)を含む $50\mu l$ の細胞用培地中に $4^\circ C$ で30分間細胞を再懸濁し、そして再びPBSで洗浄した。

30 それらを $200\mu l$ の細胞用培地に再懸濁し、フローサイトメトリーにより分析した。

【0035】この結果、4クローニングが目的の抗原に対し陽性を示すことが判明した。

【0036】上記スクリーニング工程で得られた4クローニングをそれぞれ、BALB/cマウスの胸腺細胞（約 1×10^6 個/mI）を含む細胞用培地で1個/0.2 mIとし96ウエルマイクロタイヤープレートの各ウエルに植え込んだ。 $37^\circ C$ 、5%炭酸ガス条件下で培養後7~14日で、肉眼で認められるコロニーが形成された。こうして得られたコロニーについて上記と同様にスクリーニングおよびクローニングを行い、最終的にβ₁ペプチドに対するウサギ抗血清（アメリカ、ハーバードメディカルスクール、Michael B. Brenner博士から入手）を用いてウエスタン・ブロッティングによる確認操作を行い、ヒトイントグリンβ₁を特異的に認識する单クローニング株を得た（120kDaのβ鎖の部位に発色を認めた）。

【0037】得られた单クローニング株は「抗ヒトイントグリンβ₁ モノクローナル抗体（TN114）产生ハイブリドーマ」と表示し、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託した〔受託番号、微工研菌寄第13202号（F

ERM P-13202)】。

【0038】実施例2

ヒトインテグリン β_1 を特異的に認識するモノクローナル抗体: 予め 2,6,10,14-テトラメチルベンタデカン(ナカライトスク製) 0.5 ml を腹腔内投与したBALB/cマウス(3匹)に対し、実施例1で得られた抗ヒトインテグリン β_1 モノクローナル抗体(TN114)産生ハイブリドーマ(1×10^7 個)を腹腔内に接種した。約1週間後にハムスター抗ヒトインテグリン β_1 モノクローナル抗体(TN114)を含む腹水(約3ml/マウス)を得た。

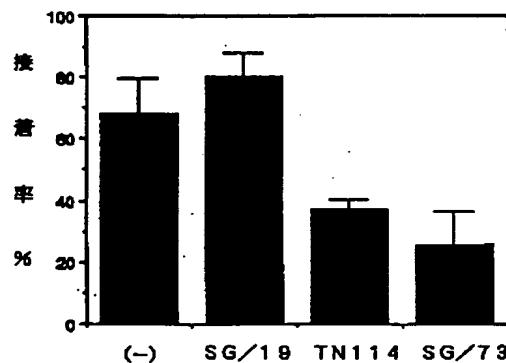
【0039】次に、得られた腹水約10mlにPBS 20

mlを加え、4°CにおいてPBSで1夜透析した。これを0.2μmのフィルターに通した後、プロテインGセファロース4ファーストフロー(ファルマシア製)カラムで分離精製し、再び、4°CにおいてPBSで1夜透析し、ハムスター抗ヒトインテグリン β_1 モノクローナル抗体(TN114)のPBS溶液5mlを得た(濃度: 100μg/ml)。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のモノクローナル抗体(TN114)が10ヒトB細胞リンパ腫(RPMI 18866)のフィブロネクチンに対する接着を抑制することを示す図である。

【図1】



フロントページの続き

(51) Int.CI.⁵

識別記号

府内整理番号

F I

技術表示箇所

//(C12P 21/08

C12R 1:91)

(C12N 5/20

C12R 1:91)

(72) 発明者 八木田 秀雄

東京都板橋区小豆沢3丁目9番2-610号

(72) 発明者 奥村 康

千葉県千葉市中央区松波1丁目14番9号